# 掀开土壤生物“暗物质”——土壤病毒的神秘面纱*



王光华

中国科学院东北地理与农业生态研究所 哈尔滨 150081

**摘要** 病毒是地球上数量最多的生命体，在调控寄主群落结构、促进元素生物地球化学循环和生物进化中起到重要的作用。病毒被喻为生物“暗物质”。近年来，海洋环境下病毒生态学研究进展迅速；与此相反，在陆地生态系统，特别是土壤环境中病毒研究进展缓慢。文章从生态学角度对目前有关土壤病毒丰度、形态多样性、基因多样性、研究方法和生态功能等进行简要的阐述，目的在于呼吁从事土壤微生物和土壤生态学研究的工作者重视对土壤病毒的研究工作，从而促进土壤病毒生态学科的发展。

**关键词** 土壤病毒，噬菌体，多样性，宏基因组，病毒生态

DOI 10.16418/j.issn.1000-3045.2017.06.004

“病毒”是令人感到不愉快，甚至感到恐惧的词汇。提起病毒，人们自然而然地想到它是引起多种农作物病害和人畜疾病的重要元凶，特别是与人类健康和生命息息相关的多种流行性、难治愈的传染性疾病的病原多是由病毒引起的，如流感病毒、SARS病毒、艾滋病病毒和埃博拉病毒等。故此人们“谈毒色变”，希望人类生活环境中最好远离病毒，甚至希望病毒从地球上消失。但在现实生活中，这种想法是无法实现的，因为病毒是地球生物圈中数量最多的生命体，保守估算全球病毒数量 $>10^{31}$ [1]。凡是有生物的地方都会存在病毒，病毒是无处不在的，同时病毒也是地球生态系统不可或缺的重要成员。

## 1 生命之树与生命第四域

1977年，Woese依据核糖体核苷酸序列将生物划分为细菌域、古菌域和真核生物域，从而构建了生命之树。地球上所有具有细胞结构的生物在这棵枝繁叶茂的大树上都可找到自己的位置，但这颗大树上没有病毒的位次。病毒无法置于生命之树上的原因一方面是病毒结构简单，主要由外壳蛋白和包裹在外壳蛋白内的核酸两部分组成，没有核糖体结

*资助项目：中科院战略性先导科技专项（B类）（XDB15010103），国家自然科学基金项目（41271262、41571246）
修改稿收到日期：2017年5月2日

构，无法进行比较；另一方面过去人们认为病毒不能独立进行自我繁殖，不属于生物，不应该置于生命之树上。但最近巨大的咪咪病毒（Mimivirus）和潘多拉病毒（Pandoravirus）的发现，颠覆了人们对病毒知识的认识，巨型病毒的发现有可能将病毒划分为生命的第四个域——病毒域[2]。Brüssow[3]认为在地球上至少存在两套大的DNA序列空间，一套是基于壳蛋白编码的病毒（capsid-encoding viruses），另一套则是基于核糖体编码的有细胞生物（ribosome-encoding cells）。Rohwer 和 Edwards[4]依据 105 个完整测序噬菌体氨基酸序列，构建并提出了噬菌体蛋白组树（Phage Proteomic Tree）的分类方法。他们发现该系统发育树与国际病毒分类委员会（ICTV）制定的分类系统相吻合，这表明病毒的分类进入后基因组时代（post-genomic era）。事实上，细菌、古菌和真核生物中的每一个生物体都被一种或多种病毒所侵染，而正是由于病毒作为遗传物质"搬运工"所起到的穿梭作用，才推动了地球生物的进化演替，才会形成如此丰富多彩的地球生态系统。

## 2 土壤生物"暗物质"——土壤病毒

土壤是微生物的主要栖息地，包括细菌、真菌、古菌、原生动物等，而这些微生物均受到各种各样病毒的侵染，所以土壤也是病毒最主要的分布场所。近年来，海洋、湖泊等水生环境中病毒生态学研究进展非常迅速；与此相对应，由于受到土壤异质性和土壤隔离的限制，学术界对土壤中病毒的研究和认识非常有限。鉴于我们对自然环境中病毒知识的匮乏，病毒常被比喻为生物界中的"暗物质"[5]，那么土壤病毒无疑是土壤生物中的"暗物质"。我们对土壤病毒的了解尚处于初始阶段，土壤病毒多样性及生态功能有待学术界的共同努力，以期揭开神秘的面纱。

### 2.1 土壤病毒存在状态及数量

土壤中原核微生物（细菌和古菌）的数量远大于真核生物，侵染原核微生物的病毒被称为噬菌体，因此噬菌体是土壤中主要的病毒类群。众所周知，噬菌体生活史存在两种状态（烈性噬菌体和溶原性噬菌体），以及病毒粒子被土壤颗粒吸附和病毒粒子微小等原因，对土壤病毒数量的精确测定一直以来是一个挑战性的课题[6]。

大约 99% 的土壤微生物是不可培养的，目前对土壤微生物数量测定普遍采用的方法是定量 PCR 技术，但该技术无法用于测定土壤中病毒数量。其原因是病毒的基因序列变异非常大，在病毒中没有发现存在共有的保守序列，因此无法设计通用引物，进而不能通过定量 PCR 技术检测到土壤中病毒的数量。但对某些特定病毒，可以基于该病毒基因组序列的测序结果，设计引物，检测其在土壤中的动态变化[7]。

土壤病毒（主要是噬菌体）存在状态有 3 种：少部分病毒以游离状态存在，大部分病毒（超过 90%）被土壤颗粒吸附而固定，其他部分则以溶原状态存在于寄主细胞中。土壤矿物组成、阳离子交换量、有机质含量、pH 值、离子浓度等，以及病毒种类都会影响到病毒在土壤中的吸附量[6]，所以测定土壤病毒数量的前提是要将病毒粒子从土壤中分离出来。人工配制的多种提取剂，如营养肉汤（NB）培养液、牛肉浸膏、甘油溶液、焦磷酸钠和柠檬酸钾溶液等常被用来分离提取土壤中的病毒。不同提取剂对病毒的提取效率存在差异，有研究发现，10% 的牛肉浸膏和 250 mmol/L 的甘油溶液对接种到土壤中的噬菌体提取效果好，但 1% 的柠檬酸钾溶液从自然土壤中提取出的病毒颗粒最多，平均为 $1.5\times10^9$ VLP（virus-like particle）/克干土[8]。由于牛肉浸膏和甘油溶液的粘滞性，对后期病毒的浓缩和提纯有妨碍，所以采用无机盐类溶液作为土壤病毒提取剂会更合适。

传统的土壤病毒计数方法是采用透射电镜观察，这种方法成本高，费时费力。而将病毒颗粒用核酸染料染色，然后采用荧光显微镜观察计数是目前快速测定环境样品中病毒数量的主流做法。采用该方法研究发现，海水中病毒数量在 $10^5$—$10^7$ VLP/mL[9,10]，河口或湖泊中病毒数量可达到 $10^8$ VLP/mL[11]；相对于水体环境，土

壤中病毒丰度可高达 $10^9$ VLP/克干土[12]。不同土地利用方式对土壤病毒丰度影响很大，森林土壤中病毒数量在 $1.31\times10^9$—$4.17\times10^9$ VLP/克干土之间，明显高于农业土壤中的病毒数量（$0.87\times10^9$—$1.1\times10^9$ VLP/克干土）[13]；Chen 等人[14]发现不同施肥处理下红壤耕作层病毒数量在 $1.34\times10^7$—$13.1\times10^7$ VLP/克干土之间，以施用氮磷钾化肥（NPK）配施有机肥（M）处理最高，单施氮肥（N）处理最低。需要指出的是由于浸提剂提取效率的限制，以及部分土壤细菌存在溶原性噬菌体[15]，真实的土壤病毒数量要高于观测到的数值。

病毒与细菌的比值（VBR）也是表征环境病毒数量状况的一个指标。不同环境中的 VBR 相差很大，海洋和湖泊水体环境中 VBR 在 3—25 之间[9,10,16]，稻田田面水 VBR 在 0.11—72 之间[17]。与水体环境相比较，土壤环境中 VBR 变化较大，如农田土壤中 VBR 大约 3 000，森林土壤中 VBR 为 10[13]，而在沙漠表层土壤中的 VBR 数量只有 0.15—1.66[18]。此外，Swanson 等人[19]发现小麦根际病毒数量没有体现出明显的根际效应，从而导致非根际土壤的 VBR 明显高于根际土壤（非根际为 4.68，根际为 0.27）。土壤环境中 VBR 数值变化幅度大，表明调控土壤病毒数量的因子不单单取决于其寄主细胞的数量，其他土壤非生物因子也可能起到非常重要的作用。总体而言，环境中的病毒数量至少要高出其寄主数量的 10 倍[4]。

### 2.2 土壤病毒形态

土壤病毒形态是多样的。由于病毒粒子微小，对病毒形态的观察只能借助于电子显微镜技术。Williamson 等人[13]发现美国特拉华州土壤中病毒主要存在形式是噬菌体，且以有尾噬菌体为主；在有尾噬菌体中短尾噬菌体（Podophage）和长尾噬菌体（Siphophage）所占的比例高于肌尾噬菌体（Myophage）；他们还发现土壤中存在线型（Filamentous）和头部长型的噬菌体。而 Swanson 等人[19]对英国一个地点小麦根际和非根际土壤样品研究发现，根际与非根际土壤不同形态病毒分布比例没有明显差异，主要以无尾的、小的球型病毒为主，有尾噬菌体所占比例只有 5% 左右，在有尾噬菌体中又以短尾噬菌体为主。同样，Chen 等人[14]也发现我国红壤农田中存在多种病毒形态，但无尾噬菌体所占的比例明显高于有尾噬菌体。需要指出的是，由于病毒粒子与土壤颗粒结合紧密，在土壤病毒提取和透射电镜观察过程中，一些有尾噬菌体的尾部结构可能会丢失或被截断，从而妨碍我们对土壤中真实病毒形态的描述[20]。

环境中病毒头部大小也是用来描述病毒形态的指标之一。海水、湖泊及稻田田面水中病毒头部大小在 30—60 nm 之间，头部小于 30 nm 和大于 100 nm 的病毒所占比例很小[9,10,21,22]。病毒粒子大小与其侵染寄主类型有一定的关联性，一般侵染原核微生物的噬菌体头部尺寸小，而感染真核生物的病毒头部尺寸大，如感染真核藻类病毒的头部大小平均为 150 nm[23]。最近，有科学家从智利海岸河流沉积物和澳大利亚淡水池塘泥浆中分离获得了两株感染变形虫的巨大病毒，即潘多拉病毒，其直径可达 1 000 nm[24]。这突破了人们对病毒粒子大小的认知，引发学术界的广泛关注。

### 2.3 溶源性噬菌体

土壤中还有一部分病毒为温和性噬菌体，温和性噬菌体是以溶源状态存在于寄主细胞中。处于溶源状态的噬菌体在土壤中具有独特的生存优势，特别是在寄主分布不均匀[25]、寄主丰度低[26,27]或寄主细胞营养状况不良[26,28]的情况下，溶源状态是确保噬菌体在寄主种群中长期存活的最有效的生存策略。研究发现土壤中溶源性噬菌体占的比例要远高于海洋环境[15]，大约 30% 从土壤中分离到的可培养细菌中含有溶源性噬菌体[29]，而采用非培养的方法发现有 22%—68% 的温带土壤和 4%—20% 南极的寒地土壤中检测到有溶源性噬菌体的存在[15]。溶源性噬菌体也是极端沙漠条件下噬菌体生存的主要方式。研究发现，撒哈拉沙漠表层沙子温度高，游离的病毒颗粒难以存活，从表层沙子中不能直接提取和观察到病毒粒子的存在，但将沙子中细菌细胞进行丝裂霉素 C 处理后，发现释放出大量的有尾噬菌体[30]。此外，对已测序完成

的土壤细菌全基因组分析发现，多个细菌基因组中含有1个或多个前噬菌体元件（prophage element）[31]。前噬菌体元件可能携带有利于特定条件下寄主生存和增殖的基因，从而使土壤病毒通过基因溶源性转换（lysogenic conversion）方式使寄主获得新的性状和功能，从而具有更强的环境适应能力和生存优势[32-34]。

### 2.4 土壤病毒遗传基因多样性

自然环境中不同病毒基因组大小存在差异，利用脉冲场凝胶电泳（PFGE）技术可以粗略地对环境病毒基因组大小进行区分，对病毒群落结构组成进行解析[35-37]。目前利用PFGE技术主要是针对水体环境中的病毒群落进行研究，尚未见针对土壤环境的研究报道。为了进一步较为精确地解析环境中病毒群落结构组成，Winget和Wommack[38]提出采用RAPD-PCR技术研究环境病毒群落结构的方法。Srinivasiah等人[39]采用该技术对南极土壤和温带土壤病毒群落结构进行了研究，发现病毒群落结构因不同地区类型和土地利用方式存在较大差异。采用RAPD-PCR技术解析环境病毒遗传基因多样性的前提条件是要确保提取到的环境病毒遗传物质中不含其他生物遗传物质的污染。

采用特定的引物PCR扩增不同的分子标记基因是解析环境微生物基因多样性和群落结果组成的常用方法。遗憾的是，到目前为止，在病毒中没有发现可用于所有病毒基因多样性研究的保守序列[40]。但最近宏基因组研究发现，病毒某些家族的结构或功能蛋白氨基酸片段序列高度保守，利用这些保守氨基酸片段序列设计出的简并性引物，可用于PCR扩增出环境中相关基因序列，用于解析病毒遗传基因多样性[4]。这些基因主要有T4型噬菌体的*g23*基因[41,42]，蓝藻噬菌体的*g20*[43,44]、*psbA*和*psbD*基因[45,46]，T7型噬菌体的DNA *pol*基因[47,48]等。2014年Adriaenssens和Cowan[49]在*Applied and Environmental Microbiology*撰文详细列举了多个可用于环境病毒生态学和多样性研究的分子标记基因。需要指出的是，到目前为止，针对上述噬菌体基因研究主要集中在海洋、湖泊、稻田等水体环境，而针对土壤环境研究很少。Srinivasiah等人[50]对美国旱地土壤中*g23*、*g20*和DNA *pol*基因进行PCR扩增，但均未成功。他们认为土壤与水体环境相差巨大，从而导致土壤中病毒组成与水体中完全不同，用于研究水体病毒基因组成的PCR引物可能不适合用于土壤环境。近年来，笔者所在研究团队致力于开展针对东北稻田和黑土中噬菌体基因多样性的研究工作。我们成功地从旱地黑土农田中捕获到了T4型噬菌体*g23*基因，发现旱地黑土农田*g23*基因分布与其在海洋和湖泊水体环境中完全不同，而是与稻田环境相近，但也有多个新的黑土类群存在[51,52]。此外，我们还利用研究海洋中噬菌体多样性的多对引物，对东北稻田生态系统包括水体和土壤中多个分子标记基因组成进行了解析，揭示出稻田生态系统中病毒也含有与寄主功能相似的辅助代谢基因*psbA*和*phoH*，发现稻田噬菌体群落结构组成与海洋海水和湖泊淡水环境完全不同，发现和建立了多个稻田独特的噬菌体类群。由此可见，我们有限的研究结果已表明在陆地生态系统中，特别是土壤中，生存着遗传信息独特的病毒类群，土壤中的病毒是一个尚待挖掘的宝贵基因库。

## 3 环境病毒宏基因组学研究

随着测序技术的发展，高通量测序技术越来越多地应用到环境微生物生态学研究工作中。鉴于目前在病毒中没有发现通用引物，所以不依赖于特定引物扩增的病毒宏基因组学研究是近年来国际上一个研究热点[53-57]。事实上，与其他环境微生物宏基因组学相比较，病毒是最适宜研究其宏基因组的一类生命体。这一方面归因于环境病毒体积小（除巨大病毒外），易于将其从环境中分离出来，且病毒外部包裹着牢固的蛋白质外壳，保护内部遗传物质不被外部核酸酶降解，从而便于分离提纯病毒遗传物质；另一方面也与病毒基因组小（特别是噬菌体），在基因序列拼接组装和基因信息分析上具有明显的优势有关[58-60]。环境病毒不仅包含侵染原核生物的噬菌

体，还含有侵染真核生物，如植物、动物、原生生物和真菌等的病毒，所以对环境病毒宏基因组学的解析就不单纯只是噬菌体，还含有其他病毒。但由于环境中原核生物相对其他生物而言数量巨大，所以在环境病毒中，以侵染细菌和古菌的噬菌体占绝大部分。

环境病毒宏基因组学研究的关键是如何确保获得的病毒遗传物质不含寄主遗传物质的污染。为此，许多学者进行了多种研究方法上的探讨，包括微孔滤膜过滤法、DNase和RNase消解病毒浓缩液中寄主游离遗传物质法、PEG病毒浓缩、$FeCl_3$或CsCl超离心收集病毒等[56,61,62]。Thurber等[59]在*Nature Protocols*杂志上撰文，归纳介绍了如何从水体样品中收集、浓缩病毒遗传物质以用于病毒宏基因组学研究的方法。该文以及后续陆续报道的新的研究方法为环境病毒宏基因组学研究提供了有价值的参考。病毒宏基因组学研究另一个需要考虑的问题是提取到的病毒遗传物质量很少，不能直接用于高通量测序。因此，必须经过体外扩增以增加病毒遗传物质的含量，通常采用的方法：一是采用Phi29 DNA聚合酶进行扩增，即多重置换扩增（MDA）技术[57,59]；二是采用连接扩增（LASL）技术。Kim和Bae[63]发现这两种扩增技术在解析病毒宏基因组组成存在差异，采用MDA得到的病毒数据多是来自单链DNA病毒，只有极小部分属于双链DNA病毒；而采用LASL得到的病毒数据全部来自于双链DNA病毒。

对环境病毒宏基因组数据的解析和分析是目前制约该领域研究的另一个瓶颈问题。由于环境病毒数据库的匮乏，研究者获得的绝大多数数据来源不清，为未知序列。即使在剩下的已知序列中，也只有很小一部分被归为病毒范畴，大部分属于细菌，还有一部分属于真核生物和古菌范围[53,55,57]。得到这样结果并不奇怪，因为病毒在进化过程中不断地从寄主处获得新基因，以利于其生存；同时病毒也将自身携带的遗传基因，通过水平移动的方式传递给寄主，从而促进寄主的进化或获得新的功能。虽然只有部分宏基因组序列可归为已知病毒序列，但目前对这些序列的分析还仅限于不同病毒家族所占的相对比例，深度分析还很缺乏。国际上对环境病毒基因组学研究多是针对水体环境[64-66]，针对土壤环境中病毒宏基因组研究还很少报道。

## 4 土壤病毒的生态功能

尽管土壤中病毒丰度很高，但科学界对土壤病毒的生态功能知之甚少，对土壤病毒生态功能的推测主要是基于海洋生态系统的相关研究发现。从大的方面来讲，环境病毒的生态功能主要有3方面：（1）调控寄主群落结构。众所周知，自然生态系统中有两种主要现象调控微生物群落结构，即从底向上（Bottom-up）和从上而下（Top-down）的两个生态过程[67,68]。噬菌体调控细菌群落结构是一种经典的Top-down调控，虽然学术界意识到该调控作用的重要性，但对这一调控过程的研究还处于黑箱状态，已有的报道主要是针对特定噬菌体及其寄主的动态变化[69]，尚缺乏群落水平的研究结果。唯一见到的一篇相关文章是Allen等人[70]以茶提取物作为噬菌体抑制剂添加到阿拉斯加土壤中，发现添加茶提取物显著地降低了土壤中噬菌体数量，但增加了微生物生物量和土壤呼吸速率，但该文对细菌群落结构是否产生影响没有报道。（2）直接或间接参与元素地球化学循环。病毒的这种作用体现在它的感染率、致死率、病毒的周转时间和巨大的病毒数量上。病毒感染在引起寄主细胞死亡裂解的同时，也促发寄主细胞营养元素释放到环境中去，进而促进了元素的生物化学循环，这种由病毒介导的食物链传递方式叫做Viral loop。有报道指出，在海洋中由病毒推动的碳循环量占该生态系统碳循环总量的6%—26%[9]。与此相对应，土壤病毒，特别是土壤噬菌体在多大程度上促进了元素循环还未见报道。（3）作为基因水平移动的媒介。这个功能不难理解，正是病毒与寄主的共进化推动了地球生物群落不断演替，形成了如此多样性的地球生态系统[71]。

## 5 展望

自从1915年英国细菌学家Frederick Twort和1917年法裔加拿大微生物学家Felix d'Herelle发现噬菌体至今，有关病毒的研究工作经历了整整百年的历程。最初的研究工作主要是针对特定病毒或噬菌体，研究的目的多是从实用角度出发，如防控植物和动物类病毒性疾病，采用噬菌体疗法防治细菌性疾病或病害，等等。进入21世纪，伴随着研究技术的进步，海洋科学家发现，病毒特别是噬菌体是海洋生态系统中最丰富的生命体，病毒在海洋生态系统物质循环、能量流动，以及维持海洋生物多样性和生物进化等方面起到重要的作用。与火热的海洋病毒生态学研究相反，有关陆地生态系统，特别是土壤环境中病毒生态学的研究却远远滞后。鉴于土壤种类的多样性和土壤环境的高度异质性，土壤中病毒组成可能比海洋流动的水体环境更复杂、更多样。近20年来，我国土壤微生物生态学研究进展迅速，取得了许多具有显示度的研究成果，这些微生物包括细菌、真菌和古菌，以及一些功能性的微生物，但很少涉及到土壤中病毒生态学研究。伴随着研究手段的进步和人们对环境病毒生态功能认识的逐步深化，土壤病毒生态学研究将是下一阶段土壤微生物生态学研究的热点领域之一，我国应该迎头赶上，抢占先机。通过学术界的共同努力，揭示出土壤病毒多样性、群落结构组成，以及与寄主群体协同进化关系，明确病毒在土壤生态系统中的地位和作用，从而掀开土壤生物"暗物质"——土壤病毒的面纱，促进土壤病毒生态学的发展。

## 参考文献


1 Suttle C A. Viruses in the sea. Nature, 2005, 437(7057): 356-361.

2 Pennisi E. Ever-bigger viruses shake tree of life. Science, 2013, 341(6143): 226-227.

3 Brüssow B. The not so universal tree of life or the place of viruses in the living world. Philosophical Transactions of Royal Society B, 2009, 364(1527): 2263-2274.

4 Rohwer F, Edwards R. The phage proteomic tree: a genome based taxonomy for phage. Journal of Bacteriology, 2002, 184(16): 4529-4535.

5 生物探索. 噬菌体: 开启生物宇宙暗物质研究大门. [2013-09-13]. http://www.biodiscover.com/news/research/105866.html.

6 Kimura M, Jia Z J, Nakayama N, et al. Ecology of viruses in soils: past, present and future perspectives. Soil Science and Plant Nutrition, 2008, 54(1): 1-32.

7 Ratti C, Budge G, Ward L, et al. Detection and relative quantitation of soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and polymyxa graminis in winter wheat using real-time PCR (*Taq*Man). Journal of Virological Methods, 2005, 122(1): 95-103.

8 Williamson K E, Wommack K E, Radosevich M. Sampling natural viral communities from culture-independent analyses. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(11): 6628-6633.

9 Weinbauer M G. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(2), 127-181.

10 Wommack K E, Colwell R R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 69-114.

11 Hennes J E, Suttle C A. Direct of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. Limnology and Oceanography, 1995, 40: 1050-1055.

12 Reavy B, Swanson M M, Taliansky M. Viruses in soil. In: Dighton J, Krumins J A. (eds.). Interactions in Soil: Promoting Plant Growth. Netherlands: Springer, 2014. 163-180.

13 Williamson K E, Radosevich M, Wommack K E. Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. Applied Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3119-3125.

14 Chen L, Xun W B, Sun L, et al. Effect of different long-term fertilization regimes on the viral community in an agricultural

soil of Southern China. European Journal of Soil Biology, 2014, 62(6): 121-126.

15 Williamson K E, Radosevich M, Smith D W, et al. Incidence of lysogeny within temperate and extreme soil environments. Environmental Microbiology, 2007, 9(10): 2563-2574.

16 Fuhrman J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature, 1999, 399(6736): 541-548.

17 Nakayama N, Okumura M, Inoue K, et al. Seasonal variations in abundances of virus-like particles and bacteria in the floodwater of a Japanese paddy field. Soil Science and Plant Nutrition, 2007, 53(4): 420-429.

18 Gonzalez-Martin C, Teigell-Perez N, Lyles M, et al. Epifluorescent direct counts of bacteria and viruses from topsoil of various desert storm regions. Research in Microbiology, 2013, 164(1): 17-21.

19 Swanson M M, Fraser G, Daniell T J, et al. Viruses in soils: morphological diversity and abundance in the rhizosphere. Annals of Applied Biology, 2009, 155(1): 51-60.

20 Williamson K E, Helton R R, Wommack K E. Bias in bacteriophage morphological classification by transmission electron microscopy due to breakage or loss of tail structures. Microscopy Research and Technique, 2012, 75(4): 452-457.

21 Proctor L M. Advances in the study of marine viruses. Microscopy Research Technique, 1997, 37(2): 136-161.

22 Nakayama N, Okumura M, Inoue K, et al. Morphological analysis of viral communities in the floodwater of a Japanese paddy field. Soil Biology & Biochemistry, 2008(12), 39: 3187-3190.

23 Van Etten J L, Lane K C, Meints R H. Viruses and virus like particles of eukaryotic algae. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1991, 55(4): 586-620.

24 Philippe N, Legendre M, Doutre G, et al. Pandoraviruses: Amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic Eukaryotes. Science, 2013, 341 (6143): 281-286.

25 Stewart F M, Levin B R. The population biology of bacterial viruses: why be temperate. Theoretical Population Biology, 1984, 26(1): 93-117.

26 Marsh P, Wellington E M H. Phage-host interactions in soil. FEMS Microbiology Ecology, 1994, 15(1-2): 99-107.

27 Pantastico-Caldas M, Duncan K E, Lstock C A, et al. Population dynamics of bacteriophage and bacillus subtilis in soil. Ecology, 1992, 73(5): 1888-1902.

28 Williamson S J, Houchin L A, McDaniel L, et al. Seasonal variation in lysogeny as depicted by prophage induction in Tampa Bay, Florida. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 4307-4314.

29 Williamson K E, Schnitker J B, Radosevich M, et al. Cultivation-based assessment of lysogeny among soil bacteria. Microbial Ecology, 2008, 56(3):437-447.

30 Prigent M, Leroy M, Confalonieri F, et al. A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara desert. Extremophiles, 2005, 9(4): 289-296.

31 Srividhya K V, Krishnaswamy S. Identification and analysis of prophages and phage remnants in soil bacteria. In: Witzany G. (ed.). Biocommunication in Soil Microorganisms, Soil Biology 23. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2010. 137-160.

32 Barksdale L, Arden S B. Persisting bacteriophage infections, lysogeny, and phage conversions. Annual Review of Microbiology, 1974, 28(4): 265-299.

33 Barondess J J, Beckwith J. Bor gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane. Journal of Bacteriology, 1995, 177(5): 1247-1253.

34 Waldor M K, Mekalanos J J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science, 1996, 272: 1910-1914.

35 Wommack K E, Ravel J, Hill R T, et al. Population dynamics of Chesapeake Bay virioplankton: total-community analysis

by pulsed-field gel electrophoresis. Applied Environmental Microbiology, 1999, 65(1): 231-240.

36 Steward G F, Montiel J L, Azam F. Genome size distributions indicate variability and similarities among marine viral assemblages from diverse environments. Limnology and Oceanography, 2000, 45(8): 1697-1706.

37 Parada V, Baudoux A C, Sintes E, et al. Dynamics and diversity of newly produced virioplankton in the North Sea. The ISME Journal, 2008, 2(9): 924-936.

38 Winget D, Wommack K E. Randomly amplified polymorphic DNA PCR as a tool for assessment of marine viral richness. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(9): 2077-2092.

39 Srinivasiah S, Lovett J, Polson S, et al. Direct assessment of viral diversity in soils by random PCR amplification of polymorphic DNA. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(18): 5450-5457.

40 Paul J H, Sullivan M B, Segall A M, et al. Marine phage genomics. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 133(4): 463-476.

41 Filée J, Tétart F, Suttle C A, et al. Marine T4 type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. Proceeding National Academy of Science the USA, 2005, 102(35): 12471-12476.

42 Jia Z, Ishihara R, Nakajima Y, et al. Molecular characterization of T4-type bacteriophages in a rice field. Environmental Microbiology, 2007, 9(4): 1091-1096.

43 Zhong Y, Chen F, Wilhelm S W, et al. Phylogenetic diversity of marine cyanophage isolates and natural virus communities as revealed by sequences of viral capsid assembly protein gene *g20*. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1576-1584.

44 Short C M, Suttle C A. Nearly identical bacteriophage structural gene sequences are widely distributed in both marine and freshwater environments. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 480-486.

45 Sullivan M B, Lindell D, Lee J A, et al. Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. PLoS Biology, 2006, 4(8): 1344-1357

46 Chénard C, Suttle C A. Phylogenetic diversity of sequences of cyanophage photosynthetic gene *psbA* in marine and freshwaters. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5317-5324.

47 Breitbart M, Miyake J H, Rohwer F. Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences. FEMS Microbiology Letters, 2004, 236(2): 249-256.

48 Labonté J M, Reid K E, Suttle C A. Phylogenetic analysis indicates evolutionary diversity and environmental segregation of marine podovirus DNA polymerase gene sequences. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3634-3640.

49 Adriaenssens E M, Cowan D A. Using signature genes as tools to assess environmental viral ecology and diversity. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(15): 4470-4480.

50 Srinivasiah S, Bhavsar J, Thapar K, et al. Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments. Research in Microbiology, 2008, 159(5): 349-357.

51 Wang G, Yu Z, Liu J, et al. Molecular analysis of the major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in an upland black soil in Northeast China. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(3): 273-282.

52 Liu J, Wang G, Zheng C, et al. Specific assemblages of major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages isolated from upland black soils in Northeast China, Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(9): 1980-1984.

53 Books D J, Smith D L, McDonald J E, et al. 454-pyrosequencing: a molecular battiscope for freshwater viral ecology. Genes, 2010, 1(2): 210-226.

54 Roossinck M J, Saha P, Wiley G B, et al. Ecogenomics: using

massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. Molecular Ecology, 2010, 19 (Supplement 1): 81-88.

55 Alhamlan F S, Ederer M M, Brown C J, et al. Metagenomics-based analysis of viral communities in dairy lagoon wastewater. Journal of Microbiological Methods, 2013, 92(2): 183-188.

56 Hurwitz B L, Sullivan M B. The Pacific Ocean Virome (POV): a marine viral metagenomic dataset and associated protein clusters for quantitative viral ecology. PLoS One, 2013, 8(2): 269-284.

57 Fancello L, Trape S, Robert C, et al. Viruses in the desert: a metagenomic survey of viral communities in four perennial ponds of the Mauritanian Sahara. The ISME Journal, 2012, 7(2): 359-369.

58 Angly F E, Felts B, Breitbart M, et al. The marine viromes of four oceanic regions, PLoS Biology, 2006, 4(11): e368.

59 Thurber R V, Haynes M, Breitbart M, et al. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. Nature Protocols, 2009, 4(4): 470-483.

60 Bibby K, Viau E, Peccia J. Viral metagenome analysis to guide human pathogen monitoring in environmental samples. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(4): 386-392.

61 John S G, Mendez C B, Deng L, et al. A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation. Environmental Microbiology Reports, 2011, 3(2): 195-202.

62 Hall R J, Wang J, Todd A K, et al. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. Journal of Virological Methods, 2014, 195(1): 194-204.

63 Kim K H, Bae J W. Amplification methods bias metagenomic libraries of uncultured single-stranded and double-stranded DNA viruses. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(21): 7663-7668.

64 Winter C, Garcia J A L, Weinbauer M G, et al. Comparison of deep-water viromes from the Atlantic ocean and the Mediterranean sea. PLoS One, 2014, 9(6): e100600.

65 Martinez J M, Swan B K, Wilson W H. Marine viruses, a genetic reservoir revealed by targeted viromics. The ISME Journal, 2014, 8(5): 1079-1088.

66 Aw T G, Howe A, Rose J B. Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of thevirological quality of wastewater. Journal of Virological Methods, 2014, 210: 15-21.

67 Lenoir L, Persson T, Bengtsson J, et al. Bottom–up or top–down control in forest soil microcosms? Effects of soil fauna on fungal biomass and C/N mineralization. Biology and Fertility of Soils, 2007, 43(3): 281-294.

68 Thomas W C, David W G S, Stephen M T, et al. Top-down control of soil fungal community composition by a globally distributed keystone consumer. Ecology, 2013, 94(11): 2518-2528.

69 Ashelford K E, Fry J C, Bailey M J, et al. Characterization of six bacteriophages of *Serratia liquefaciens* CP6 isolated from sugar beet phytosphere. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(5): 1959-1965.

70 Allen B, Willner D, Oechel W C, et al. Top-down control of microbial activity and biomass in an Arctic soil ecosystem. Environmental Microbiology, 2009, 12(3): 642-648.

71 Thingstad T F, Lignell R. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. Aquatic Microbial Ecology, 1997, 13(1): 19-27.

# Lift Mysterious Veil of Soil Virus: 'Dark Matter' of Soil Biota

Wang Guanghua

( Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China )

**Abstract** Viruses are the most abundant biological entities on the Earth, they play important roles in altering their host community structures, driving global biogeochemical cycles, and promoting the biological evolution. Viruses are commonly regarded as 'dark matter' of biota. Recently, the researches on viral ecology are progressing rapidly in marine environments, while the corresponding studies in terrestrial ecosystem especially in soil environments were largely lagged. In this paper, the recent research progress on soil virus, such as viral abundance, morphological and genetic diversity, research methodology, and ecological functions were briefly reviewed from the viewpoint of ecology. The purpose of this paper aims at calling for scientists who engaged in soil microorganism and soil ecology research to pay attention on the study of soil virus, and finally promote the development of soil viral ecology.

**Keywords** soil virus, bacteriophage, diversity, metagenome, viral ecology

**王光华** 中科院东北地理与农业生态所研究员。2010年入选中科院“百人计划”项目，目前担任中科院黑土区农业生态重点实验室副主任、农田分子生态学科组组长，黑龙江省微生物学会副理事长。主要从事黑土土壤微生物生态、环境病毒生态和植物病害生物防治等方面研究工作，发表*SCI*学术论文60多篇。E-mail: wanggh@iga.ac.cn

**Wang Guanghua** Received B.S. and M.S. degrees from Heilongjiang Bayi Agricultural University, and Ph.D. degree from Harbin Institute of Technology. He was elected as the Hundred Talents Program of Chinese Academy of Sciences (CAS) in 2010. Now he is the Professor and research group leader of molecular ecology of farmlands in Northeast Institute of Geography and Agroecology, CAS. He also serves as the vice director of Key Laboratory of Mollisols Agroecology, CAS, and the vice president of Microbiology Society of Heilongjiang Province. His major research fields include soil microbial ecology in black soils, environmental viral ecology, and biocontrol of plant diseases. He has published more than 60 *SCI* papers. E-mail: wanggh@iga.ac.cn